

11 Rec'd PCT/PTO

13 OCT 1989

PCT/JP89/00337

30.03.89

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 06 JUL 1989

WIPO PCT

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。  
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 1988年3月31日

出 願 番 号  
Application Number: 昭和63年特許願第80829号

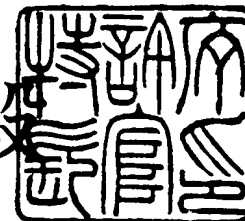
出 願 人  
Applicant(s): 松下電器産業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1989年4月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

吉田文毅



出証平 1-95397

(14,000円)

## 特 許 願 (82)

昭和63年3月31日

特 許 庁 長 官 殿

## 1 発 明 の 名 称

バイオセンサ及びその製造方法

## 2 請求項の数 7

## 3 発 明 者

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地  
松下電器産業株式会社内  
氏 名 河 栗 真 理 子  
(ほか3名)

## 4 特許出願人

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地  
名 称 (582) 松下電器産業株式会社  
代表者 谷 井 昭 雄

## 5 代 理 人 〒571

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地  
松下電器産業株式会社内  
氏 名 (5971) 弁理士 中 尾 敏 男  
(ほか1名)

〔連絡先 電話(東京)437-1121 東京法務分室〕

## 6 添付書類の目録

|             |     |
|-------------|-----|
| (1) 明 細 書   | 1 通 |
| (2) 図 面     | 1 通 |
| (3) 委 任 状   | 1 通 |
| (4) 願 書 副 本 | 1 通 |
| (5) 優先権主張書  | 1 通 |

7 前記以外の発明者および代理人

(1) 発明者

|    |  |                        |
|----|--|------------------------|
| 住所 | <small>カドマ シ オオアザカドマ</small><br>大阪府門真市大字門真1006番地 | <small>バンチ</small>     |
|    | <small>マツシタデンキサンギョウ</small><br>松下電器産業株式会社内       | <small>ナイ</small>      |
| 氏名 | <small>フジ</small><br>藤                           | <small>ク</small><br>田  |
|    |  | <small>マ</small><br>真  |
|    |  | <small>ユ</small><br>由  |
|    |  | <small>ミ</small><br>美  |
| 住所 | 同  | 所                      |
| 氏名 | <small>ナン</small><br>南                           | <small>カイ</small><br>海 |
|    |  | <small>シ</small><br>史  |
|    |  | <small>ロウ</small><br>朗 |
| 住所 | 同  | 所                      |
| 氏名 | <small>イイ</small><br>飯                           | <small>ジマ</small><br>島 |
|    |  | <small>タカ</small><br>孝 |
|    |  | <small>シ</small><br>志  |

(2) 代理人

|    |                  |
|----|------------------|
| 住所 | 大阪府門真市大字門真1006番地 |
|    | 松下電器産業株式会社内      |
| 氏名 | (6152) 弁理士 粟野重孝  |

63-80829

(14,000 円)

## 特 許 願 (63)

昭和 63 年 3 月 31 日

特 許 庁 長 官 殿

## 1 発 明 の 名 称

バイオセンサ

## 2 請 求 項 の 数 3

## 3 発 明 者

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地  
 松下電器産業株式会社内  
 氏 名 南 海 史 朗  
 (ほか3名)

## 4 特 許 出 願 人

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地  
 名 称 (582) 松下電器産業株式会社  
 代 表 者 谷 井 昭 雄

## 5 代 理 人 〒 571

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地  
 松下電器産業株式会社内  
 氏 名 (5971) 弁理士 中 尾 敏 男  
 (ほか 1 名)

〔連絡先 電話(東京)437-1121 東京法務分室〕

## 6 添付書類の目録

|     |         |   |   |
|-----|---------|---|---|
| (1) | 明 細 書   | 1 | 通 |
| (2) | 図 面     | 1 | 通 |
| (3) | 委 任 状   | 1 | 通 |
| (4) | 願 書 副 本 | 1 | 通 |

7 前記以外の発明者および代理人

(1) 発明者

|     |                          |
|-----|--------------------------|
| 住 所 | 大阪府門真市大字門真1006番地         |
| 氏 名 | 松下電器産業株式会社内<br>河 巢 真 理 子 |

|     |     |
|-----|-----|
| 住 所 | 同 所 |
|-----|-----|

|     |           |
|-----|-----------|
| 氏 名 | 藤 田 真 由 美 |
|-----|-----------|

|     |     |
|-----|-----|
| 住 所 | 同 所 |
|-----|-----|

|     |         |
|-----|---------|
| 氏 名 | 飯 島 孝 志 |
|-----|---------|

(2) 代理人

|     |                                   |
|-----|-----------------------------------|
| 住 所 | 大阪府門真市大字門真1006番地                  |
| 氏 名 | 松下電器産業株式会社内<br>(6152) 弁理士 栗 野 重 孝 |

## 明 細 書

### 1、 発明の名称

バイオセンサ

### 2、 特許請求の範囲

(1) 絶縁性の基板上に、カーボンを主体とする少くとも測定極と対極からなる電極系を設け、前記電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を備えたことを特徴とするバイオセンサ。

(2) 絶縁性の基板上に、カーボンを主体とする少くとも測定極と対極からなる2組の電極系を設け、一方の電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を備え、他方の電極系上に親水性高分子層あるいは親水性高分子と失活させた酸化還元酵素からなる層を備えたことを特徴とするバイオセンサ。

(3) 電極系が、カーボンを主体とする測定極と対極および銀／塩化銀参照極からなる参照極であることを特徴とする請求項1または2に記載のバイオセンサ。

### 3、 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡便に定量することのできるバイオセンサに関する。

#### 従来技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なう事なく簡易に定量しうる方式として、特開昭61-294351号公報に記載のバイオセンサを提案した（第5図）。このバイオセンサは、絶縁性の基板1上にスクリーン印刷等の方法でカーボンなどからなる電極系8（8'）、9（9'）、10（10'）を形成し、この上を酸化還元酵素と電子受容体を担持した多孔体12で覆い保持枠11とカバー13で全体を一体化したものである。試料液を多孔体上へ滴下すると、多孔体に担持されている酸化還元酵素と電子受容体が試料液に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。反応終了後、この還元された電子受

容を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

#### 発明が解決しようとする課題

このような従来の構成では、電極系を含む基板面の濡れが必ずしも一様とならないため、多孔体と基板との間に気泡が残り、応答電流に影響を与えたり反応速度が低下する場合があった。また、試料液中に、電極に吸着しやすい物質や電極活性な物質が存在するとセンサの応答に影響がみうけられた。

#### 課題を解決するための手段

本発明は上記課題を解決するため、絶縁性の基板上にカーボンを主体とする少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を備えたものである。

さらには、絶縁性の基板上に、カーボンを主体とする少なくとも測定極と対極からなる2組の電極系を設け、一方の電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を備え、他方の電極



系上に親水性高分子層あるいは親水性高分子と失活させた酸化還元酵素からなる層を備えたものである。

#### 作用

本発明によれば、極めて容易に精度よく基質濃度を測定することができ、かつ、保存性に優れたディスポーザブルタイプのバイオセンサを構成することができる。

#### 実施例

以下、本発明を実施例により説明する。

##### （実施例 1）

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。

第 1 図は本発明のバイオセンサの一実施例として作製したグルコースセンサの断面図であり、第 2 図はセンサ作製に用いた電極部分を斜視図で示したものである。

ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板 1 に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード 2, 3 (3') を形成する。次に、樹

脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、測定極4、対極5からなる電極系を形成する。さらに、電極系を部分的に覆い、電極の露出部分の面積を一定とし、かつリードの不要部を覆うように絶縁性ペーストを印刷し、加熱処理をして絶縁層6を形成する。

次に、4、5（5'）の露出部分を研磨後、空气中で100℃にて4時間熱処理を施した。このようにして電極部分を構成した後、親水性高分子として、カルボキシメチルセルロース（以下CMCと略す）の0.5wt%水溶液を電極上へ展開、乾燥しCMC層を形成する。次に、このCMC層を覆うように、酵素としてグルコースオキシダーゼ（GOD）をリン酸緩衝液に溶解したものを展開し、乾燥させ、CMC-GOD層7を形成した。この場合、CMCとGODは部分的に混合された状態で厚さ数ミクロンの薄膜状となっている。

上記のように構成したグルコースセンサのCMC-GOD層の上へ試料液としてグルコース標準液を10 $\mu$ l滴下し、滴下1分後に電極間に1V

のバルス電圧を印加することにより、測定極をアノード方向へ分極した。

添加された試料液は酵素、CMCを溶解し粘調な液体となりながら電極面上を速やかに拡がり、気泡の残留は認められなかった。これは、電極上に予め形成された親水性高分子層により電極面の濡れが向上したことによるものと考えられる。

一方、添加された試料液中のグルコースは電極上に担持されたグルコースオキシダーゼの作用で酸素と反応して過酸化水素を生成する。そこで、上記のアノード方向への電圧印加により、生成し過酸化水素の酸化電流が得られ、この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。

第3図は、上記構成になるセンサの応答特性の一例として、電圧印加5秒後の電流値とグルコース濃度との関係を示すものであり、極めて良好な応答性が得られた。

#### (実施例2)

実施例1と同様にしてスクリーン印刷により、第2図に示した電極部分と同じものの2組をポリエ

チレンテレフタレートからなる 1 枚の絶縁性の基板上に近接して形成した。次に、2 組の電極系の上に実施例 1 と同様にして CMC 層を形成した後、一方の電極系の CMC 層の上にだけ前記同様にして GOD-CMC 層を形成した。

上記の様にして得られた 2 組の電極系を有するグルコースセンサについて、各々の電極系の上へ種々の濃度のアスコルビン酸を含むグルコース標準液 ( $200\text{ mg/dl}$ ) を滴下し、実施例 1 と同様に、1 分後に 1 V の電圧を印加し、5 秒後の電流値を測定した。結果を第 4 図に示す。CMC-GOD 層の電極系の出力を A で、また、CMC 層だけの電極系の出力 (ブランク出力) を B でそれぞれ示す。図より明らかなように、A の出力はアスコルビン酸の濃度増加とともに増大し、一方 B の出力も同様な増加がみられる。これはアスコルビン酸に対する各々の電極系の感度がほぼ等しいことを示している。これより、両電極系の出力の差 ( $A - B$ ) を検出するとグルコースに基く電流値が得られる。すなわち、2 組の電極系を用い

ることにより電極活性な物質による誤差を大幅に低減することができる。この様な効果はアスコルビン酸以外にも、尿酸などについても認められた。

この様に、2組の電極系を設け、一方の電極系に親水性高分子-酵素層、他方の電極系に親水性高分子層だけを形成して、センサを構成することにより、妨害物質を含む試料液中の基質濃度を精度よく測定することができる。

上記において、両方の電極系にCMC-GOD層を形成した後、一方の電極系についてのみレーザー照射による局部加熱、紫外線照射などを施すことによりGODを失活させて、ブランク出力用の電極系としても良い。こうすると酵素活性以外は両電極系の構成が同一となり、両電極系の妨害物質による出力電流をさらによく一致させることができ、センサ検出精度を向上することができる。

また、以上の実施例においては電極部分が測定極と対極の2電極からなる電極系について述べたが、電極系を銀/塩化銀を加えた3電極から構成することにより、さらに精度を向上することがで

きる。電極系を構成する方法の一例としては、3本の銀リードを基板上に印刷した後、2本のリード先端部の上にだけカーボンペーストを印刷し、絶縁層をコートした後、銀が露出している残り1本のリード先端部について、その表面を処理して塩化銀を形成し、銀／塩化銀電極とするなどがある。

親水性高分子としてはCMCの他にゼラチンやメチルセルロースなども使用でき、デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの吸水性あるいは水溶性の親水性高分子を適当な濃度の溶液にしたものを塗布、乾燥することにより、必要な膜厚の親水性高分子層を電極上に形成することができる。

さらに、酸化還元酵素としては上記実施例に示したグルコースオキシダーゼに限定されることはなく、アルコールオキシダーゼやコレステロールオキシダーゼなど種々の酵素を用いることができ

る。

#### 発明の効果

以上のように、本発明のバイオセンサは、電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を形成することにより、また、さらには2組の電極系を設け、一方の電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を、他方の電極系上に親水性高分子層あるいは親水性高分子と失活させた酸化還元酵素からなる層をそれぞれ形成することにより、信頼性の高い応答を得ることができる。さらに、電子受容体を担持する必要がないため、簡略な構成とすることができ、安価で保存性に優れたバイオセンサを提供することができる。

#### 4、図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例であるバイオセンサの断面図、第2図は電極部分の斜視図、第3図および第4図はバイオセンサの応答特性図、第5図は従来のバイオセンサの分解斜視図である。

1 ……絶縁性の基板、2, 3, 3' ……リード、

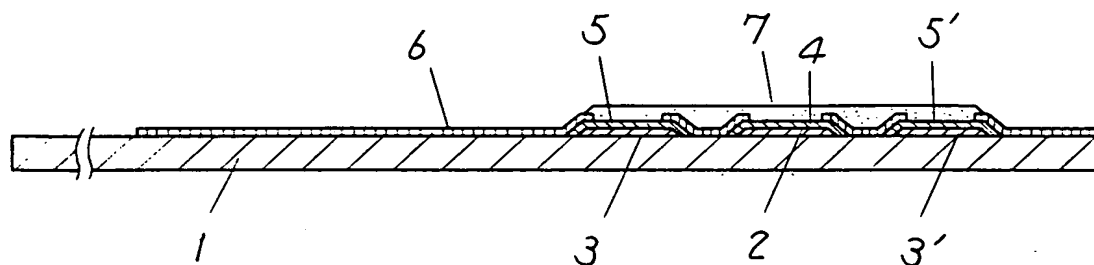
4, 9, 9' ……測定極、5, 5', 8, 8' …  
…対極、6 ……絶縁層、7 ……CMC-GOD層、  
10, 10' ……参照極、11 ……保持棒、12  
……多孔体、13 ……カバー。

代理人の氏名 弁理士 中尾敏男 ほか1名

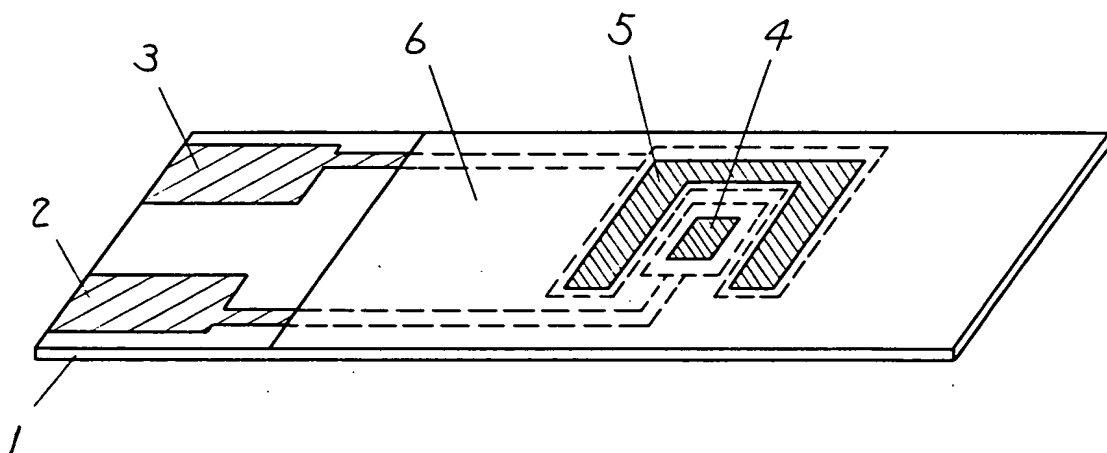


- 1 --- 絶縁性の基板  
 2, 3, 3' --- リード  
 4 --- 測定極  
 5, 5' --- 対極  
 6 --- 絶縁層  
 7 --- CMC-GOD層

第 1 図



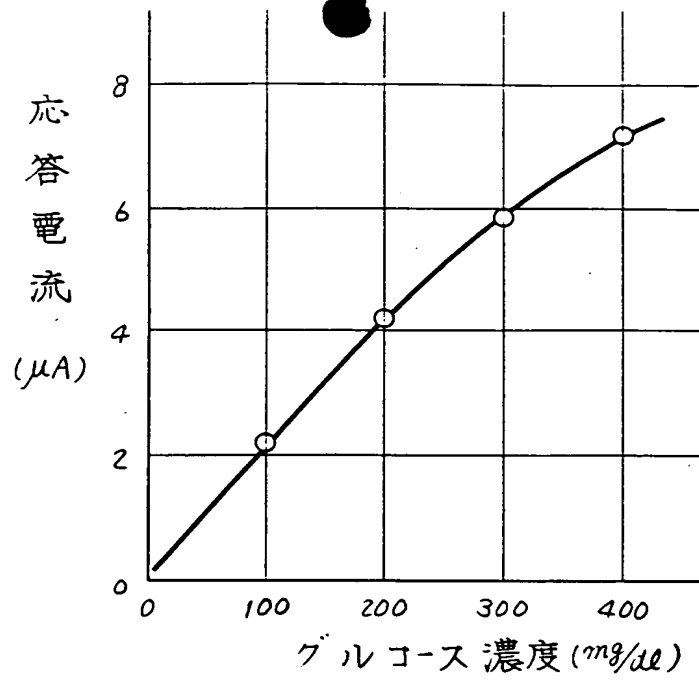
第 2 図



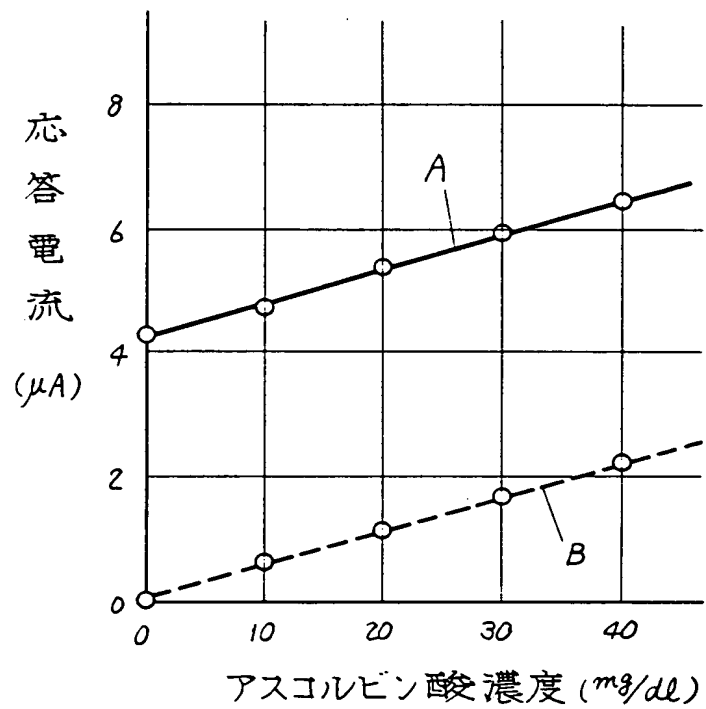
代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか1名



第 4 図

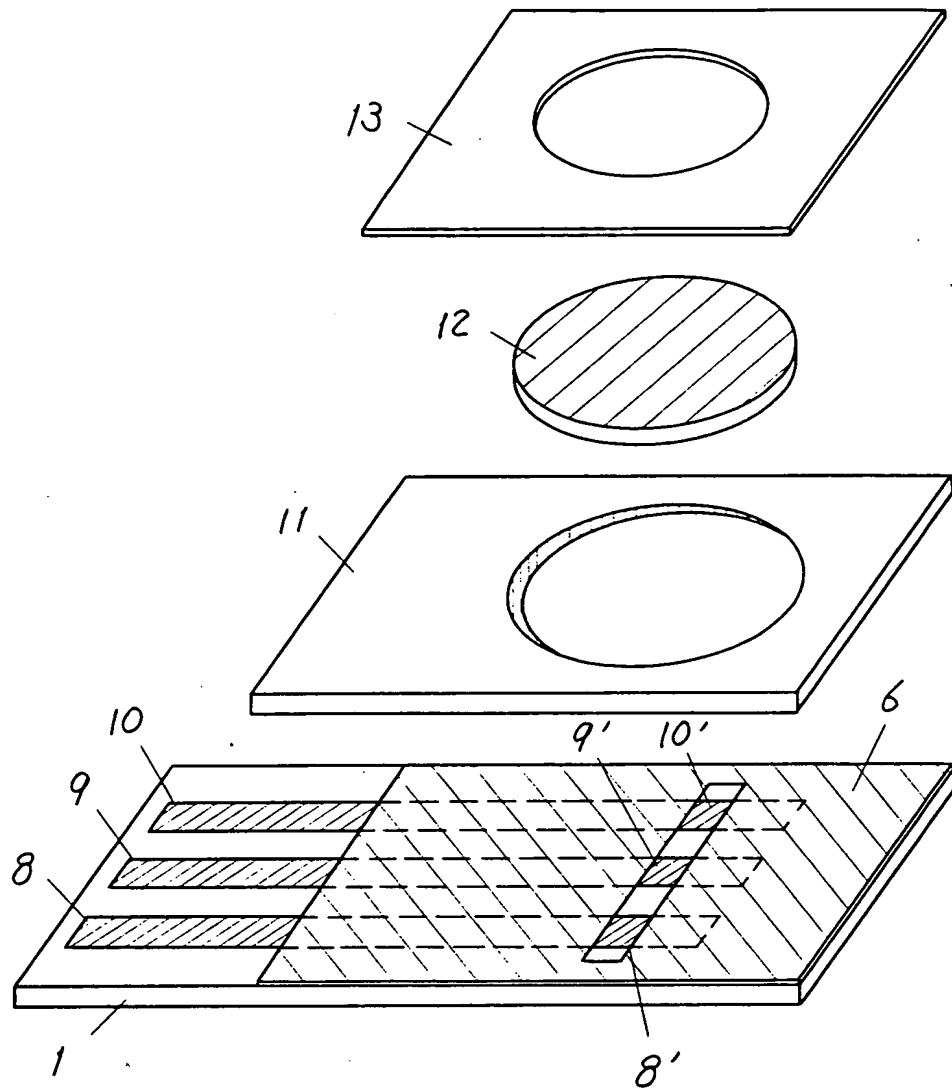


代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか 1 名

第 5 図



代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか1名